



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80150** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
C12N 11/10 (2006.01)
C12N 5/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 14513	(72) Винахідник(и): Пастер Ігор Петрович (UA), Тронько Микола Дмитрович (UA)
(22) Дата подання заявки: 18.12.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 13.05.2013	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ РЕЧОВИН ІМ. В.П. КОМІСАРЕНКА НАМН УКРАЇНИ", вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114 (UA), Пастер Ігор Петрович, вул. Драгоманова, 13/10, кв. 14, м. Київ, 02068 (UA), Тронько Микола Дмитрович, вул. Тарасівська, 36-а, кв. 31, м. Київ, 01032 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 13.05.2013, Бюл.№ 9	

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ АЛЬГІНАТНИХ МІКРОКАПСУЛ

(57) Реферат:

Спосіб виготовлення альгінатних мікрокапсул включає формування альгінатних мікрокапсул, їх полімеризацію, промивання та інкубацію з барвником трипанового синього. Трипановий синій додають на етапі полімеризації.

UA 80150 U

Корисна модель належить до біотехнології, зокрема виготовлення альгінатних мікрокапсул.

Найчастіше альгінатні мікрокапсули з напівпроникними мембранами застосовують для захисту ендокринних тканин або клітин від реакції відторгнення при трансплантації реципієнту з гормональною недостатністю та дозволяють тривало функціонувати в умовах *in vivo*.

Відомий спосіб виготовлення альгінатних мікрокапсул наступним чином: через триканальний генератор альгінатних мікрокапсул подаються два розчини альгінату різної концентрації (0,50 % і 0,25 %) та кисень із швидкістю 6,0 л/хв. Отримані альгінатні мікрокапсули інкубують в розчині хлориду барію (20 ммоль/л, 290 мосмоль/л, рН 7,4) при додатковому постійному перемішуванні на магнітній мішалці з частотою 60-90 об/хв. протягом 15-20 хвилин, тричі промивають в розчині хлориду натрію (0,9 %, 290 мосмоль/л), інкубують в розчині сульфату натрію (6 ммоль/л, 290 мосмоль/л) та повторно тричі промиванням в розчині хлориду натрію (0,9 %, 290 мосмоль/л) [Патент №20743 U UA, МПК7 C12N 11/10. Опубл. 15.02.2007; Бюл. №2, 2007].

Проте, цей спосіб має недолік, оскільки технологія не дозволяє отримати візуально-контрастні альгінатні мікрокапсули.

Відомий спосіб виготовлення альгінатних мікрокапсул шляхом нанесення на мікрокапсули шару полікаціону, який мічений флюоресцеїном, з наступним дослідженням за допомогою світлової (SHB 45, Eschenbach, Germany) і скануючої конфокальної лазерної (Leica TCS NT, Leica, Germany) мікроскопії [Беляева И.Г., Галибин О.В., Вилесов А.Д. и Сухорукое Г.Б. Применение метода послойного нанесения полиэлектролитов для инкапсулирования клеток и клеточных культур // Информационный бюллетень "Клеточные культуры". - СПб., 2006. - Выпуск № 21. - С. 17-22].

Проте, цей спосіб має недоліки, оскільки в таких альгінатних мікрокапсулах недостатня стабільність контрастних речовин до дії зовнішніх фізико-хімічних чинників, що не забезпечує їх достатньої візуалізації та потребує дорогих реактивів і обладнання.

За найближчий аналог авторами взято спосіб виготовлення альгінатних мікрокапсул, який включає: а) формування мікрокапсул пропусканням через генератор мікрокапсул альгінату (0,2 %) і повітря, б) полімеризацію мікрокапсул інкубацією в розчині хлориду барію (30 ммоль/л) протягом 4 хвилин, в) багаторазове промивання мікрокапсул в розчині хлориду натрію (0,9 %), г) візуалізацію мікрокапсул інкубацією в розчині (1:1) живильного середовища RPMI 1640 і трипанового синього протягом 5 хвилин та д) повторним дворазовим промиванням мікрокапсул в розчині хлориду натрію (0,9 %) [Moskalenko V., Ulrichs K., Kerscher A. et al. Preoperative evaluation of microencapsulated human parathyroid tissue aids selection of the optimal bioartificial graft for human parathyroid allotransplantation // Transplant. International.-2007. - Vol. 20, № 8. - P. 688-696].

Недоліком цього способу виготовлення альгінатних мікрокапсул є недостатня стабільність барвника на поверхні мікрокапсул до дії зовнішніх фізико-хімічних чинників (зокрема, впливу механічних факторів, зміни осмоляльності розчину, підвищення температури середовища тощо), що погіршує візуалізацію мікрокапсул.

В основу даної корисної моделі поставлена задача розробити такий спосіб виготовлення альгінатних мікрокапсул, в якому завдяки введенню барвника на одному з технологічних етапів приготування капсул, підвищується стійкість барвника до дії зовнішніх фізико-хімічних чинників (зокрема впливу механічних факторів, зміни осмоляльності розчину, підвищення температури середовища тощо) та досягається достатня візуальна контрастність альгінатних мікрокапсул. Спосіб достатньо дешевий і технологічно простий.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі, який включає формування альгінатних мікрокапсул, їх полімеризацію, промивання та інкубацію з барвником трипанового синього, згідно з даною корисною моделлю, трипановий синій додають на етапі полімеризації.

До даного рішення автори прийшли після дослідження здатності альгінатних мікрокапсул утримувати барвник впродовж тривалого часу в умовах *in vitro* та виявленні залежності інтенсивності забарвлення мікрокапсул від етапу застосування барвника. На відміну від найближчого аналогу, запропонований авторами процес забарвлення альгінатних мікрокапсул розчином трипанового синього (0,25 %) проводять на етапі полімеризації, що дає можливість оптимізувати спосіб виготовлення альгінатних мікрокапсул, які є візуально-контрастними. Враховуючи низьку молекулярну масу трипанового синього ($M = 947$ д), його застосування на етапі полімеризації альгінатних мікрокапсул сприяє кращому контакту цього барвника з біополімером та більш стійкій фіксації його в альгінатних мікрокапсулах в порівнянні з можливим забарвленням мікрокапсул безпосередньо після їх виготовлення, що дозволяє значно підвищити контрастну візуалізацію мікрокапсул в умовах *in vitro*.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Альгінатні мікрокапсули отримують подаванням через генератор мікрокапсул розчину альгінату (2 %) і кисню, проводять полімеризацію шляхом інкубації в розчині хлориду барію (20 ммоль/л, 290 мосмоль/л, рН 7,4) і трипанового синього (0,25 %) протягом 5 хвилин та тричі промивають в розчині хлориду натрію (0,9 %).

Після отримання альгінатних мікрокапсул проводять візуальну оцінку інтенсивності забарвлення капсул за допомогою світлового мікроскопа. Далі альгінатні мікрокапсули інкубують в розчині цитрату натрію (0,05 ммоль/л) при постійному стряхуванні протягом 90 хвилин, після чого проводять спектрофотометричне визначення оптичної густини розчину при довжині хвилі 595 нм на спектрофотометрі "Spectrophotometer 6405" ("Jenway", Велика Британія).

Для встановлення переваг способу, що пропонують автори, порівняно з найближчим аналогом, проводили дослідження контрастності альгінатних мікрокапсул в умовах *in vitro*, для чого альгінатні капсули виготовляли як за найближчим аналогом (перший дослід), так і запропонованим способом (другий дослід). Через 3 і 24 години інкубації альгінатних мікрокапсул в розчині хлориду натрію (0,9 %) проводили візуальну оцінку інтенсивності їх забарвлення за допомогою світлового мікроскопа. Далі альгінатні мікрокапсули інкубували в розчині цитрату натрію (0,05 ммоль/л) при постійному струшуванні протягом 90 хвилин, після чого проводили спектрофотометричне визначення оптичної густини розчину при довжині хвилі 595 нм на спектрофотометрі "Spectrophotometer 6405" ("Jenway", Велика Британія).

Результати виготовлення альгінатних мікрокапсул показали, що через 3 години інкубації альгінатних мікрокапсул оптична густина розчину в другому досліді була на 26,5 % вищою порівняно з першим дослідом ((0,046±0,002) ум. од. проти (0,036±0,001) ум. од., $P < 0,01$) (таблиця). Через наступні 24 години інкубації оптична густина розчину в першому досліді знизилася на 70,1 % ((0,011±0,001) ум. од. проти (0,036±0,001) ум. од., $P < 0,001$), в другому досліді - на 58,5 % ((0,019±0,002) ум. од. проти (0,046±0,002) ум. од., $P < 0,001$). При цьому, оптична густина розчину в другому досліді була на 69,6 % вищою порівняно з першим дослідом ((0,019±0,002) ум. од. проти (0,011±0,001) ум. од., $P < 0,01$).

Таблиця

NN	Групи	Оптична густина розчину (ум. од.)	
		через 3 години	через 24 години
1	Перший дослід	0,036±0,001 (5)	0,011±0,001 (5)*
2	Другий дослід	0,046±0,002 (5) **	0,019±0,002 (5)*, **

Примітка. * - $P < 0,001$ порівняно з 3-ма годинами, ** - $P < 0,01$ порівняно з першим дослідом.

За результатами проведених досліджень з виготовлення альгінатних мікрокапсул, оцінки оптичної густини розчину, можна зробити висновок, що в першому дослідженні значно гірше виявлялися мікрокапсули, ніж в другому дослідженні. Крім цього, при тривалій інкубації альгінатні мікрокапсули більш інтенсивно втрачали забарвлення в першому дослідженні, ніж в другому. Для подальшого використання рекомендовано другий метод виготовлення альгінатних мікрокапсул.

Таким чином, запропонований авторами спосіб виготовлення альгінатних мікрокапсул є достатньо дешевим, технологічно простим і дозволяє підвищити візуальну контрастність альгінатних мікрокапсул в умовах *in vitro*.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виготовлення альгінатних мікрокапсул, який включає формування альгінатних мікрокапсул, їх полімеризацію, промивання та інкубацію з барвником трипанового синього, який **відрізняється** тим, що трипановий синій додають на етапі полімеризації.

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601